

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(Н И У « Б е л Г У »)**

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ
ПОПУЛЯЦИЙ КУСТАРНИКОВОЙ УЛИТКИ (*FRUTICICOLA*
FRUTICUM) УРАЛЬСКОГО РЕГИОНА**

Выпускная квалификационная работа
обучающегося по направлению подготовки 06.03.01 Биология
очной формы обучения, группы 07001418
Быльченко Александра Алексеевича

Научный руководитель
д.б.н., профессор
Снегин Э.А.

БЕЛГОРОД 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы.....	5
1.1. Систематическое положение <i>F. fruticum</i>	5
1.2. Экологическая характеристика <i>F. fruticum</i>	7
1.3. Генетическая структура популяций <i>F. fruticum</i>	11
Глава 2. Физико-географическая характеристика района исследования	18
Глава 3. Материалы и методы исследования.....	22
3.1. Ход эксперимента.....	22
3.2. Конхиометрические измерения.....	24
3.3. Методы определения генетической структуры популяций.....	25
3.4. Статистические методы обработки результатов.....	27
Глава 4. Результаты и их обсуждение.....	30
4.1. Результаты исследования морфометрической структуры популяций.....	30
4.2. Результаты исследования генетической структуры популяций.....	34
4.3. Обсуждение полученных результатов.....	36
Заключение.....	39
Список использованных источников.....	40

ВВЕДЕНИЕ

Популяционная генетика пытается объяснить процессы адаптации и видообразования и является одной из основных составляющих синтетической теории эволюции. На формирование популяционной генетики наибольшее влияние оказали Сьюэл Райт, Джон Холдейн, Рональд Фишер, Сергей Четвериков. Ключевые закономерности, определяющие частоты аллелей в популяциях, сформулированы Годфри Харди и Вильгельмом Вайнбергом.

Оценка генофонда популяций фоновых видов в экосистемах служит важным критерием для определения состояния различных условий среды. Если рассматривать генофонд популяции как совокупность аллельных состояний всех генов, представленных в особях этой популяции, то изменение генофонда популяции означает либо изменение соотношения аллельных состояний, либо появление и закрепление новых для популяции аллелей. Второй сценарий возможен либо в случае удачного мутационного процесса, либо в случае миграции на территорию популяции особей с новой вариацией признака.

Наилучшим образом изменения генофонда популяции можно проследить для малоподвижных организмов с относительно небольшим сроком жизни и, соответственно, довольно быстрой сменой поколений. Чувствительность методов биоиндикации, применяемых для оценки влияния факторов среды, нередко бывает значительно выше, чем чувствительность иных методов, например биохимических и радиационных, так как последние сильно зависят от дешифровки реального состояния параметров среды.

Учитывая данное положение неудивительно, что наземные моллюски представляют собой очень удобный и распространенный объект для исследований в области популяционной экологии, генетики и биологического мониторинга. Обладая пониженной миграционной способностью и высокой чувствительностью к изменениям условий среды, их популяции четко реагируют

на фоновые изменения различных параметров среды и являются отличными объектами для исследований микроэволюционных и гомеостатических процессов. Такие особенности сделали различные виды наземных моллюсков удобными модельными объектами популяционной экологии, что в свою очередь послужило причиной большому количеству исследований отечественных и зарубежных авторов.

Кустарниковая улитка (*Fruticicola fruticum* Müll.) в этих условиях представляет огромный интерес для исследователей ввиду своего огромного для данной систематической группы ареала и удобства работы.

Целью данной работы стал анализ морфогенетической структуры популяций кустарниковой улитки на территории Уральского региона с использованием полиморфных признаков раковины и анализа локусов неспецифических эстераз.

В рамках данного исследования были решены следующие задачи:

- 1) изучить особенности конхиометрических признаков в популяциях кустарниковой улитки;
- 2) изучить генетическую структуру популяций кустарниковой улитки с помощью фенетических (окрасочных) признаков раковины;
- 3) изучить генетическую структуру популяций кустарниковой улитки с помощью локусов неспецифических эстераз;
- 4) сравнить полученные данные с имеющимися исследованиями по данному виду;
- 5) сделать выводы о морфогенетической структуре исследуемых популяций, обозначить ее особенности.

Работа проводилась на базе Научно-исследовательского центра Геномной Селекции НИУ БелГУ.

Выпускная квалификационная работа изложена на 46 страницах. Она состоит из оглавления, введения, четырех основных разделов, заключения. Список использованных источников насчитывает 58 наименований. В работе используются 10 таблиц и 7 рисунков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Систематическое положение *F. fruticum*

Кустарниковая улитка (*F. fruticum* Müll.), также относимая рядом авторов к роду *Bradibaena*, ввиду своего широкого распространения на большей части территорий Европы, а также удобства в работе, приобрела ценность в проведении различных исследований в области генетики, популяционной экологии, а также биологического мониторинга. Вид был хорошо изучен и описан в отечественной и зарубежной литературе.

Данный моллюск был описан в 1774 году Отто Мюллером, изначально был ошибочно отнесен к семейству *Helix*. Современное систематическое положение этого вида представлено в таблице 1.

Таблица 1

Систематическое положение кустарниковой улитки

Систематическая группа	Название группы
Тип	Mollusca (Моллюски)
Класс	Gastropoda (Брюхоногие)
Отряд	Pulmonata (Легочные)
Подотряд	Stylommatophora (Стебельчатоглазые)
Надсемейство	Helicoidea
Семейство	Bradybaenidae
Род	<i>Fruticicola</i>

Раковина улиток данного вида почти шаровидная, тонкостенная. Эмбриональные обороты раковины гладкие, структура дефинитивных оборотов содержит небольшие спиральные бороздки и тонкие морщины. Среди принятых обозначений окраски раковин кустарниковой улитки указываются:

- 1) Ц₁ – темная красно-коричневая окраска;
- 2) Ц₂ – каштановая или желто-коричневая окраска;
- 3) Ц₃ – светлая кремово-желтая окраска.

У взрослых улиток в раковине насчитывается 5–6 полных оборотов, причем последний оборот сильно вздут, широко закруглен и несколько опус-

кается к устью. Ширина последнего оборота примерно в 1,5 раза шире, чем предпоследнего, все обороты отделены друг от друга четким умеренно – глубоким швом [Шилейко 1978].

Окраска мантии улиток обычно соответствует окраске раковины. Печень темная, часто просвечивает через тонкую раковину. Внешний вид Кустарниковой улитки представлен на рисунке 1 [Задвинский, 2015].



Рис. 1. *Fruticicola fruticum* (Müll.)

1.2. Экологическая характеристика *F. fruticum*

Кустарниковая улитка (*F. fruticum* Müll.) рассматривается как реликт древней теплолюбивой фауны, в третичное время распространенной на территории современной Сибири и Северной Европы [Фауна ..., 2006].

Вид обычен в подстилке смешанных лесов, под камнями известняка и мела. В условиях засухи улитки концентрируются в пазухах листьев. Вид встречается в самых разнообразных растительных ассоциациях, всюду имея достаточно высокую численность, причем заходит в горные и степные ландшафты. Интересным представляется огромный ареал кустарниковой улитки по сравнению с родственными ей видами, зачастую имеющими весьма ограниченное распространение. При этом примечательно, что расселение многих из них тесно связано с синантропизацией мест обитаний с соответствующим комплексом растительности [Зейферт, Хохуткин, 1995].

В Уральском регионе *F. fruticum* (Müll.) встречается на территории смешанных лесов, состоящих преимущественно из лиственницы, липы, березы, дуба и осины [Хохуткин, 1997; Снегин, 2011]. Также для данного вида характерно обитание в опушечных луговых биотопах на границе со смешанными лесами, где, на время зимовки, улитки перебираются в лес, где отмечается в слое листового опада, иногда зарываясь в землю на 15–20 сантиметров. На лесных участках демонстрируют, в период активности очень низкую популяционную плотность. В то же время, на травянистых биотопах плотность популяции крайне велика [Яворницкий, Здун, 1985]. В травянистом ярусе, помимо основных кормовых растений, моллюски замечены на большом количестве различных травянистых растений и на листьях невысоких деревьев, кустарников и кустарничков [Хохуткин, 1997].

Приуроченность кустарниковой улитки во всех без исключения биотопах Урала к двум основным видам кормовых растений – крапиве двудомной (*Urtica dioica*) и таволге, или лабазнику (*Filipendula ulmaria*) – весьма характерна и связана с пищевой избирательностью. В природных условиях живот-

ные располагаются на листьях этих растений, на стеблях встречаются реже. Волоски крапивы не представляют никакой опасности для моллюсков, более того, они часто сидят на них, и большие участки листьев поедаются сплошь. В биотопах других ландшафтных зон вид может предпочитать и другие растения, такие как лопух, хмель и др., однако следует отметить высокую кормовую ценность крапивы, служащей основным источником пищи улиток данного вида во множестве различных исследованных зон. Крапива и таволга служат для кустарниковой улитки не только источником пищи, но и дневным убежищем. При повышенной влажности и температуре у поверхности почвы животные, особенно особи, не достигшие половой зрелости (молодь), поднимаются по растениям на высоту 50–60 см от поверхности земли (и вплоть до 2,5 м на деревья и кустарники), так как там, на высоте, условия влажности более благоприятны [Хохуткин, 1997]. Когда зеленые части растений отмирают (октябрь–середина ноября), улитки переходят на питание детритом, в процессе закапываясь и подготавливая себе место для зимовки [Зейферт, Хохуткин, 1995].

Концентрация как этого, так и множества других видов наземных моллюсков, внутри ареала популяции напрямую зависит от параметров почвы, на которой произрастают кормовые растения. Наиболее важную роль играет содержание в почвах ионов кальция, преимущественно в виде карбонатов. Органические соединения кальция (прежде всего, цитрат и оксалат) также оказывают существенное значение на видовое богатство и численность наземных моллюсков. Данный факт обусловлен необходимостью ионов кальция для нормальной жизнедеятельности многих наземных моллюсков. В первую очередь, кальций используется для построения раковины, также участвует во многих метаболических процессах [Bayer, Saari, 1977; Wareborn, 1979].

К другим важным параметрам почвы относят концентрацию и состав органической составляющей, влажность почвы и показатели кислотно – щелочного баланса. Прямая зависимость плотности и численности популяций

различных видов улиток от этих параметров неоднократно отмечалась в различных источниках [Johannessen, 2001; Jurikova, 2007].

Кроме того, учитывая значение наземных моллюсков как источников пищи для хищных птиц и рептилий, существует так же зависимость ряда показателей хищных видов от характеристик почвы, на которой сосредоточены моллюски, то есть их кормовая база. Например, существуют литературные данные, демонстрирующие зависимость параметров яиц птиц от концентраций кальция и pH почвы, на которой сосредоточены используемые ими в пищу моллюски [Крамаренко, 2014а].

Подробное изучение жизненного цикла кустарниковой улитки было начато К. Кюнкелем (1928) и продолжено Э. Фремингом (1939, 1954) на популяциях вида из Германии. Исследования неоднократно продолжались и дополнялись, наиболее активно в 90-е годы на популяциях данного вида в Европе, Европейской части России и Уральском регионе. Отдельные исследования проводились и в лабораторных условиях [Хохуткин, Лазарева, 1983].

Брачные игры кустарниковой улитки *F. fruticum* (Müll.) длятся около 20-ти минут. Процесс копуляции, в среднем, 4,5–5 часов, при этом вероятно, что особи оплодотворяют друг друга. Откладка яиц происходит через несколько дней после копуляции.

Следует заметить, что продолжительность различных стадий жизненного цикла *F. fruticum* (Müll.) и многих других родственных видов может существенно различаться в различных биотопах, так как зависит от температурных факторов даже больше, чем от видовой специфичности [Шешеня, 2001].

Половой зрелости на территории Уральского региона моллюски весенней генерации достигают на четвертый год, а моллюски осенней генерации на пятый. По достижению половой зрелости улитки живут около года, и погибают после зимовки, в весенний период после копуляции и кладки яиц. Копуляция взрослых особей начинается в течение одной–двух недель после выхода из спячки. В Уральском регионе копуляция начинается в промежуток

с апреля по середину мая [Хохуткин, Зейферт, 2010]. Копулирующие животные могут находиться на почве, на камнях, ветках, пнях или на травянистых растениях – предпочитают участки с большой влажностью и меньшей освещенностью. Откладка яиц происходит в промежутке от 5 суток до месяца после копуляции, наиболее продолжительные задержки регистрировались для особей, помещенных в лабораторные террариумы.

Эмбриональная стадия развития для популяций в климатических условиях Уральского региона, в среднем, длится около двух недель. Диаметр яиц составляет 2–3 мм, размер яиц зависит от времени откладки, параметров среды и параметров самих улиток. Улитки откладывают яйца порциями по 10–50 штук [Хохуткин, 1997]. Кладка происходит в гнездовые ямки, вырывааемые передней частью тела моллюска в почве или на трухлявых пнях. На кладку одного яйца в начале цикла тратится 15–20 минут, к концу перерыв может составлять 50 и более минут. Перерыв между кладками занимает, как минимум, 48 часов [Зейферт, Хохуткин, 1995]. В целом отмечено, что чем больше яиц в кладке, тем они мельче. Яйца распадаются по массе на две группы: мелкие – в среднем 8,5 мг и крупные – в среднем 12,5 мг. Отмечается также, что яйца, имеющие не круглую, а овальную форму, откладывают особи, пораженные паразитами. Очень мелкие яйца откладывают особи, не закончившие рост [Хохуткин, Зейферт, 2010].

Вылупившиеся из яйца улитки имеют диаметр около 2 мм и один зародышевый оборот. Нарастание новых оборотов происходит по мере развития улитки, в среднем на один оборот тратится около года. Цвет раковины на начальных этапах развития трудноразличим ввиду ее тонкости и хрупкости, по этой же причине молодь некоторое время питается в детрите, и несколько позже выходит на зеленые растения [Хохуткин, 1997].

1.3. Генетическая структура популяций *F. fruticum*

На протяжении последних сорока лет ведутся исследования популяционной структуры кустарниковой улитки (*F. fruticum* Müll.) с использованием генетических методов анализа и полиморфных признаков раковины [Снегин, Снегина, 2017]. Генетические методы исследования играют основную роль в исследованиях последних лет, что, однако, не отменяет большого значения исследований морфологии.

Для описания фенетического проявления значимых морфологических признаков наземных моллюсков введены непрерывный и дискретный типы изменчивости [Хохуткин, 1997].

Непрерывная изменчивость признака – вид изменчивости, при которой значение признака может быть представлено любым вариантом из некоторого интервала. Среди морфометрических характеристик наземных моллюсков такому варианту изменчивости соответствуют различные размерные характеристики – количество оборотов раковины, диаметр, высота раковины, размеры устья, масса моллюсков и др.

Дискретная изменчивость выражается в проявлении признака лишь в нескольких возможных значениях, то есть – только в отдельных вариантах. В первую очередь, это касается различных показателей окраски и опоясанности.

Непрерывный и дискретный типы изменчивости, безусловно, не имеют принципиальных генетических различий, но для удобства исследования морф их обычно рассматривают независимо. В самом общем виде признаки, формирующие параллельные ряды изменчивости в ареале разных видов, адаптивны к тем или иным факторам биогеоценоза. Закономерности этих адаптаций выражены в основных эколого-географических правилах изменчивости морфометрических признаков наземных моллюсков:

- 1) в оптимальных климатических условиях моллюски достигают наибольших размеров;

- 2) в условиях засухи или сильной инсоляции возрастает относительная масса раковин
- 3) в теплом климате возникает тенденция к светлому окрасу раковины и увеличению ее скульптурированности, в более холодных значениях наблюдается обратная тенденция [Хохуткин, 1997].

Морфологические признаки кустарниковой улитки – это в первую очередь, характеристики раковины. Адаптационное значение конхиологических признаков, в основном, отмечается для дискретных вариантов, например, для различных вариантов окраски. Считается, что светлая кремово – желтая окраска защищает моллюсков от перегрева на солнечных лучах, тогда как более темные варианты наоборот, нужны для лучшего прогрева в условиях недостаточной освещенности [Снегин, 2013]. Это подтверждаются исследованиями популяций на границе лугового и лесного участков, где наибольшая концентрация более темных вариантов окраски преобладала на лесных участках ареала, а более светлый окрас чаще регистрировался на травостое [Хохуткин, Зейферт, 2010; Яворницкий, Здун, 1985]. Кроме того, для исследованного вида существует зависимость проявления светлого варианта окраски (Ц₃) в местах с повышенным радиационным фоном [Снегин, 2010].

В конце двадцатого века были проведены исследования по оцениванию коэффициента наследуемости для конхиометрических признаков, которые показали, что основные промеры раковины на 20–60% детерминируются генотипом особи [Крамаренко, 2014а]. При этом наиболее четко детерминированы показатели окраски и опоясанности раковины. Так, окраска желтовато-кремового цвета свидетельствует о гомозиготности улитки по аллелю желтой окраски [Снегин, 1999]. Наличие продольной полосы, просматриваемой последнем обороте и на 1–2 оборотах перед ним у шва, свидетельствует о гомозиготности по рецессивному аллелю наличия полосы [Хохуткин, 1979]. Проявление признака опоясанности представлено на рисунке 2 [Хохуткин, Зейферт, 2010].

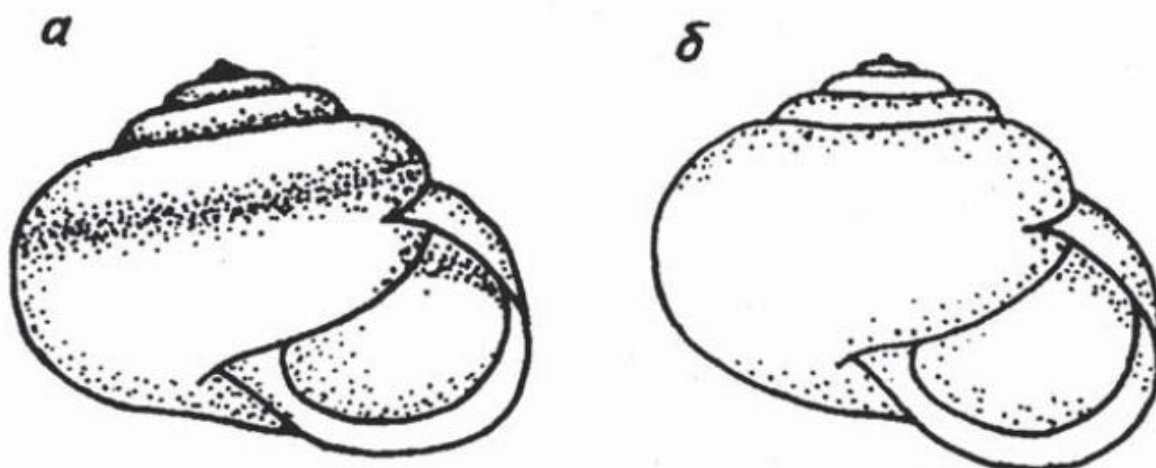


Рис. 2. Признак опоясанности раковины *Fruticicola fruticum* Müll., где а – наличие полосы (П+); б – отсутствие полосы (П–, или не указывается)

Так, практически все признаки, подчиняющиеся непрерывному типу изменчивости, демонстрируют большой процент зависимости от параметров среды, чем от генетической структуры, что, без проведения фонового мониторинга и параллельной оценки различных факторов среды, сильно снижает их ценность как характеризующих реальное состояние популяции.

Таким образом, основной проблемой при оценке морфологических признаков является их неоднозначность как характеристик жизнеспособности популяций. Кроме того, анализ одного только фенотипа, за редким исключением, исключает идентификацию внутривидовых подразделений. Причем, это утверждение целесообразно для большинства видов наземных моллюсков, включая и исследуемый. Так, выявлен подвид кустарниковой улитки, обитающий на территории Румынии, который отличается вариантами окраски и меньшим размером [Grossu, 1980]. Однако большинство внутривидовых подразделений и все виды двойники не отличаются фенотипически, поэтому основным инструментом популяционной экологии сегодня считается эколого-генетический подход [Снегин, 2006].

Основным критерием стабильного существования популяции является уровень разнообразия генетической информации. Известно, что если в изо-

лированной малочисленной популяции длительное время отсутствует обмен с другими внутривидовыми группировками, то аллельное разнообразие такой популяции уменьшается вследствие инбридинга. Этот эффект у гермафродитных моллюсков усилен возможным самооплодотворением [Baur, 2007].

Наряду с этим, на генетическую структуру популяций наземных моллюсков, как и всех других видов животных и растений, оказывает влияние большой спектр различных действующих факторов, как параметров среды, так и взаимодействия этих популяций с популяциями других видов в экосистемах и влияние антропогенных процессов. Наряду со стандартными закономерностями действия естественного отбора, учитывая особенности популяционной структуры и воспроизводства наземных моллюсков, большую роль в изменении структуры генофондов их популяций будут играть различные случайные генетические процессы. Например, часто генетический дрейф может выступать как один из основных факторов, определяющих частотное распределение фенотипов в популяциях [Крамаренко, 2014б].

Известно, что в настоящее время по ряду антропогенных и климатических причин наблюдается тенденция к сокращению популяционных ареалов. Кроме того, вследствие нарушений в результате антропогенного пресса, ареалы также зачастую становятся мозаичными. Уменьшение величины популяционных ареалов и одновременное увеличение степени изолированности особей в популяции и популяций между собой, повышает вероятность развития и закрепления в популяциях рецессивных мутаций. Данный процесс возможен у наземных моллюсков как следствие самооплодотворения или близкородственного скрещивания. Это ведет к увеличению гомозиготности особей в популяции и, соответственно, снижению генетической гетерогенности, являющейся генетическим резервом, который и обеспечивает устойчивость популяции как системы [Оценка ..., 2017].

Таким образом, оценивая степень аллельного разнообразия, которая отражает общие свойства генотипа и весь комплекс взаимодействий организма со средой, можно оценить степень устойчивости популяций в каждый

данный момент времени. А так как судьба каждого вида, включая и виды, используемые в качестве индикаторов, связана не только с физико-географическими условиями, но и с сообществом других видов, с которыми данный вид сосуществует, то его дальнейшая эволюционная судьба в значительной мере отражает судьбу всего этого биологического сообщества. Однако стоит отметить также, что никакого объективного стандарта, по которому можно было бы сравнивать уровень гетерозиготности, не существует, так как в реальных популяциях гетерозиготность сильно отличается у разных таксонов, и эволюционное значение ее до конца не понятно [Снегин, Снегина, 2017].

Для исследования популяций видов, отличающихся небольшой миграционной активностью, включая и большинство видов наземных моллюсков, удобно применять изоферментный анализ – анализ аллозимов, или аллоферментов – гомологичных вариантов различных ферментов, то есть генетически определяемых различными аллелями одного гена вариаций фермента. Такие молекулы выполняют сходные функции, и отличаются несколькими аминокислотными заменами, обычно за пределами активного центра фермента [Борисова и др., 2014]. Адаптивный характер проявления данных локусов выражен в том, что такие варианты фермента могут отличаться характеристиками активного состояния. Например, они могут работать при несколько отличных значениях pH, при различных температурных нормах, могут требовать присутствия некоторых ионов или наоборот, не нуждаться в них [Крамаренко, 2001].

Для изоферментного анализа генетической информации популяций наземных моллюсков наилучшим образом подходят исследования эстераз, супероксиддисмутаза и малатдегидрогеназы. Эти три группы ферментов неоднократно исследовались в популяциях наземных моллюсков, в том числе и исследуемой кустарниковой улитки [Матёкин, 1977; Макеева и др., 1995; Снегин и др., 2000; Снегин, 2005, 2006, 2011].

Большое количество изоферментных локусов наземных моллюсков имеют менделевский тип наследования и способны к кодоминантному проявлению [Крамаренко, 2014a]. Однако, их варианты и даже частоты могут быть близкими среди родственных таксонов, что ограничивает их использование в систематических исследованиях. С другой стороны, характер наследования этих признаков позволяет успешно использовать их для анализа внутривидовой структуры. Изменчивость изоферментных локусов используется для иллюстрации и оценки относительной важности популяционно-генетических механизмов для важных эволюционных процессов: потока генов, репродуктивной совместимости популяций, различных генетико-стохастических вариантов.

При установлении структурированности популяционной расселенности кустарниковой улитки по частотам встречаемости вариантов в полиморфных локусах изоферментов установлена тенденция к изменению частот аллелей в возрастных группах популяций с большой численностью особей. Эти данные свидетельствуют о селективной значимости вариантов генетически детерминированного полиморфизма. Также это позволяет судить, что адаптивную структуру популяций формирует естественный отбор вариантов полиморфизма [Адаптация ..., 1995].

Методы изоферментного анализа также позволяют проследивать направления и инвазивные характеристики отдельных видов животных. С помощью исследования изоферментных локусов, например, проводился мониторинг внедрения видов – иммигрантов на территории Среднерусской возвышенности и г. Белгород. Результатом применения данных методик стала оценка инвазионного потенциала и жизнеспособности видов наземных моллюсков *Stenomphalia ravergensis* (Ferussac) и *Brephulopsis cylindrica* (Menke).

Данные моллюски, являющиеся характерными для Кавказского района (*S. ravergensis* Fer.) и Крымского полуострова (*B. cylindrical* Men.) продемонстрировали высокий уровень жизнеспособности, что свидетельствует о

возможности замещения ими популяций аборигенных видов, к которым относится и кустарниковая улитка (*F. fruticum* Müll.) [Оценка ..., 2017].

Основная часть исследований популяционного генофонда, в том числе, разумеется, и исследования изоферментных локусов, посвящены кодирующей части генома, однако не меньшее значение имеют и исследования некодирующей, или «молчащей» части генетического кода. Подобные исследования активно проводятся в последние годы на наземных моллюсках, включая исследуемый вид [Снегин, 2011]. Исследования ДНК маркеров для некодирующих фрагментов генетического кода позволяет определять степень гетерозиготности и проследивать генетическое расстояние между популяциями одного или разных видов. Если анализ аллозимов мало подходит для систематических исследований ввиду сходства изоферментов многих близких таксонов, использование методик исследования некодирующей части генома напротив, отлично подходит для определения и межвидового и межпопуляционного генетического расстояния. Наиболее удобными вариантами таких методик служат [К вопросу ..., 2012]:

- а) RAPD PCR, ПЦР случайно амплифицированной полиморфной ДНК (англ. Random Amplificiated Polimorphic DNA, RAPD PCR);
- б) ISSR PCR – специализированный вариант RAPD ПЦР, в котором праймер представляет микросателлитную последовательность.

Суть данных методик заключается в том, что использованные короткие праймеры будут комплементарны большому количеству участков исследуемой ДНК. Таким образом, количество совпадений, полученных при исследовании продуктов ПЦР различных объектов одинаковыми праймерами, будет более полно отражать сходство генетического кода этих объектов, затрагивая при этом и не кодирующую часть генетического кода [Остерман, 1981].

ГЛАВА 2. ФИЗИКО-ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЙОНА ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе работы мы исследовали выборки, полученные из популяций Кустарниковой улитки (*F. fruticum* Müll.) в Уральском регионе: из города Кудымкар Пермской области и из заповедника «Оленьи ручьи» в Свердловской области, Нижнесергинский район.

Оба исследуемых участка принадлежат к Среднему Уралу и расположены на западных склонах Уральских гор. Расположение объектов на карте представлено на рисунке 3.

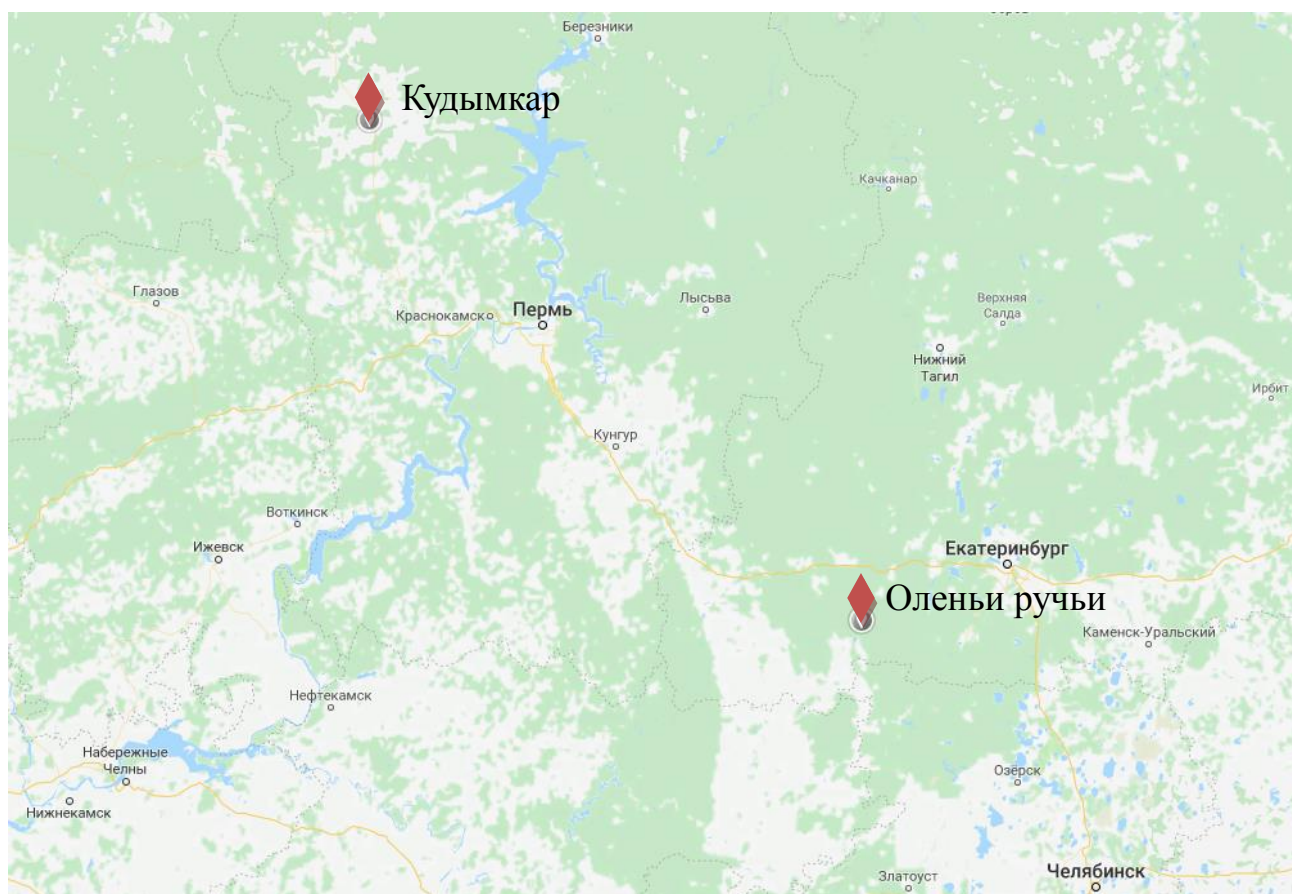


Рис. 3. Географическое расположение районов исследования

Средний Урал – самая низкая область Уральских гор, лежит между 56° и 59° северной широты. Южной границей считается гора Юрма в Челябинской области, а северной – горы Косьвинский камень и Конжаковский ка-

мень. Климат на данной территории континентальный, основную роль в его формировании играют западные Атлантические ветры и воздушные потоки с территории Северного ледовитого океана. Погодные условия на данной территории могут резко изменяться в течение дня, что также связывают с действием Атлантических ветров [Перфильев, 1992].

Зима на территории Среднего длится примерно 5 месяцев, с ноября по апрель. Зима является самым устойчивым временем года, ее начало характеризуется установлением устойчивого снежного покрова. В ясную погоду температура зимой может достигать -40°C , однако обычно температура зимой составляет от -13°C до -20°C . В горных районах таяние снегов может длиться до середины мая.

Весна продолжается с апреля до конца мая. Продолжительность весны на Урале обычно равна продолжительности осени или несколько короче её и колеблется от 33 до 48 дней. Весной также возможны резкие снижения температуры, связанные с распространением воздуха с севера. Морозы прекращаются обычно в мае, но заморозки по ночам продолжаются до конца весны.

Лето на Среднем Урале длится с июня по август, в этот период обычно выпадает большое число осадков и нередко случаются похолодания. В южной части сухая погода чаще бывает в июне, в остальной части Среднего Урала в июле.

Осень начинается в сентябре и продолжается весь октябрь. Часто идут морозящие дожди, начинается постепенное понижение температуры, возрастает облачность.

Территория Среднего Урала хорошо обособлена от остального Урала по формам рельефа – горы тут понижаются, при этом их меридиональное расположение сменяется слегка диагональным, юго- и юго-восточным. Рельеф местности представлен холмистыми равнинами, высота которых обычно не превышает 800 метров [Перфильев, 1992]. Также рельеф изрезан многочисленными реками, берущими начало на склонах гор. Реки среднего Урала входят в бассейны Волги и Оби. Помимо рек, в долинах Уфы, Тавды и Ницы

есть и пойменные озера. Крупных озер на территории региона крайне мало, и большая их часть расположена на восточных склонах.

На территории региона выделяются разнообразные почвы – горные бурые лесные, лесные подзолистые и дерново-подзолистые и горные дерновые лесные. Почвы Урала богаты солями металлов, в особенности железа, марганца, магния. Большая их часть поступает с территорий гор в период осадков или по руслам рек, крупное влияние на состав атмосферы и почв также оказывает и антропогенный фактор – для исследуемых территорий большую роль играет относительная близость к одним из крупнейших в России промышленным центрам Перми, Челябинска и Екатеринбурга.

Заповедник «Оленьи ручьи» расположен в Свердловской области между поселком Аракаево и городом Нижние Серги, вдоль нижнего течения реки Серга. Данный природный парк представляет собой территорию вокруг русла реки от Аракаево до города, площадь местности 127 км² [Хотинский, 1982].

Данный природный парк расположен на пересечении лесостепной зоны с горной тайгой, и к тому же отличается большим разнообразием рельефа местности. На территории парка расположена одна из крупнейших пещер Урала под названием «Дружба» протяженностью более полукилометра. Имеются также старые рудники, карстовые провалы. Такие сложные формы рельефа привели к неоднородности химического и механического состава почв природного парка. Основу его составляет преобладание горных бурых лесных почв на территории горной тайги и лесных дерново-подзолистых на границе лесостепного ландшафта

Город Кудымкар расположен в 200 км от города Перми на берегу реки Иньва, притоке Камы, и частично на левобережье притока Иньвы, реки Кувы. Город характеризуется расположением в небольшой долине, образованной слиянием течений Кувы и Иньвы. Русла этих рек в непосредственной близости от города имеют извилистое русло, также на реке Кува создано водохранилище, что приводит, в совокупности, к низкой скорости их течения.

Данные участки по совокупности климатических и гидрологических условий схожи между собой, однако отличаются по степени антропогенной нагрузки и почвенному составу. На территории природного парка антропогенные влияния значительно ниже ввиду его обособленности от крупных промышленных объектов – не смотря на близость к крупным металлургическим и горно-добывающим регионам, ввиду своего особого расположения относительно направления ветров, а также защитного характера рельефа, антропогенное воздействие многократно ниже, чем в черте города.

ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Ход эксперимента

Для исследований использовались замороженные улитки, собранных из заповедника «Оленьи ручьи» и города Кудымкар (сбор Э. А. Снегина, 2017 г.). Карта с изображением пунктов сбора представлена на рисунке 3. Эксперимент состоял из четырех этапов:

- 1) измерение конхиометрических показателей;
- 2) извлечение материала для изоферментного анализа;
- 3) проведение анализа локусов неспецифических эстераз;
- 4) математическая обработка результатов.

Раковины кустарниковой улитки (*F. fruticum* Müll.) крупные, поэтому конхиометрические замеры проводились с помощью штангенциркуля при нормальном положении раковины. Количество оборотов раковины и цвет раковины определялись визуально.

После проведения конхиометрических измерений, моллюск извлекался из раковины без ее внешнего повреждения – это делалось путем разрушения ретрактора раковины введением через её пупок препаровальной иглы. Данная методика позволяет получить практически неповрежденное тело моллюска и сохранить раковины как коллекционный материал. Следует отметить, что раковина кустарниковой улитки (*F. fruticum* Müll.) достаточно тонкостенные, и извлечение моллюска, в особенности молодых особей, таким методом часто сопровождается высокой вероятностью разрушения раковины или её повреждения.

Из извлеченного тела моллюска взымался материал для проведения изоферментного анализа – наиболее удобным для этого представляется извлечение ретрактора глотки – мышцы, отвечающей у брюхоногих моллюсков (Gastropoda) за работу pedalной мускулатуры [Догель, 1981]. Методика её извлечения заключается во введении хирургических ножниц или тонкого скальпеля в глотку моллюска, последующий продольный разрез головы жи-

вотного и извлечение открывшейся мышцы, расположенной под глоточным каналом. Данная методика удобна для работы с крупными взрослыми моллюсками, однако извлечение ретрактора у более мелких молодых особей вызывает сложности, поэтому для исследования эстераз молодых особей использовался кусочек мантии, полученный из ноги моллюска. Для лучшего результата необходимо провести отжимание слизи, так как её наличие в итоговом образце способно воспрепятствовать получению качественного результата.

Также следует указать, что для работы использовались стерильные лабораторные хирургические инструменты, и их чистка и термическая стерилизация в пламени спиртовки происходили после работы с каждым отдельным моллюском, что делалось для предотвращения смешению исследуемых материалов. Данный вид подготовки инструментов подходит для работы с белковыми компонентами, однако при работе с нуклеиновыми кислотами следует проводить более тщательную стерилизацию, так как контаминация даже сверхмалым количеством чужеродного генетического материала способна повлиять на дальнейшее исследование.

Исследование локусов эстераз проводилось методом вертикального гель - электрофореза, непосредственное выявление эстераз происходило методом специфической окраски геля.

Полученные в ходе конхиометрических замеров и изоферментного анализа результаты подвергались статистической обработке. Использовались основные статистические формулы, необходимые для адекватной оценки полученных результатов, их перечень будет представлен ниже в соответствующем разделе.

3.2. Конхиометрические измерения

Конхиометрические измерения раковины кустарниковой улитки проводились штангенциркулем, для предотвращения инструментальной погрешности измерения замеры проводились в нескольких повторностях (3–4 раза) с последующим выбором среднего значения. Замерялись следующие параметры раковины:

- 1) большой диаметр раковины – расстояние от устья раковины до обратной стороны последнего оборота;
- 2) малый диаметр – диаметр последнего полного оборота раковины;
- 3) высота раковины – расстояние от зародышевого завитка до нижнего края устья, перпендикулярное оси раковины;
- 4) характеристики устья раковины – высота и ширина устья.

Методика измерений, проведенных для конхиометрических признаков, представлена на рисунке 4 [Шилейко, 1978].

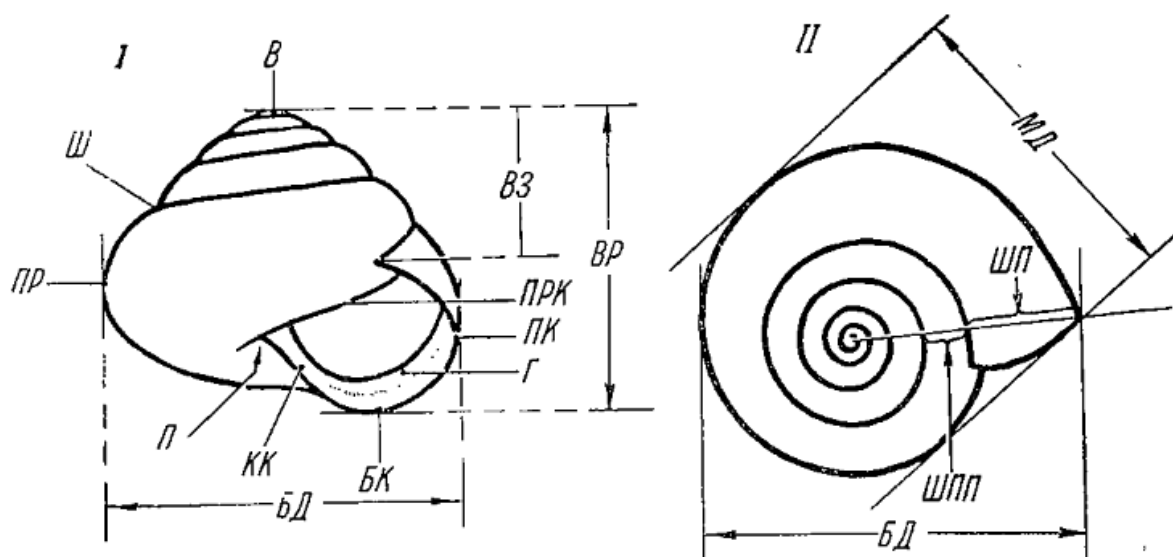


Рис. 4. Конхиометрические измерения раковины, где: I – нормальное положение раковины; II – положение раковины вершиной к наблюдателю; Б.Д. – большой диаметр раковины; М.Д. – малый диаметр раковины; В – вершина раковины; В.Р. – высота раковины; Б.К. – базальный край устья; П – пупок; П.К – палатальный край устья; К.К – колумеллярный край устья

Расстояние от П.К. до К.К. является шириной устья, а расстояние от верхушки завитка до базального края устья – его высотой. Количество оборотов измерялось при положении раковины вершиной к наблюдателю, от зародышевого завитка на вершине раковины до последнего оборота, при этом зародышевый завиток выступал в роли ориентира, относительно которого устанавливалось количество полных оборотов раковины [Шилейко, 1978]. Пример опоясанности раковины показан на рисунке 2.

3.3. Методы определения генетической структуры популяций

Определение генетической структуры популяций кустарниковой улитки (*F. fruticum* Müll.) проводилось с использованием фенетических признаков раковины и анализом локусов неспецифических эстераз.

Среди исследуемых фенетических признаков четко генетически детерминированы отдельные варианты окраски раковины и её опоясанности, о чем уже упоминалось выше.

Так, светло – желтая окраска раковины (цветовая схема Ц₃) свидетельствует у данного вида о гомозиготности особи по аллелю желтой окраски [Снегин, 1999, 2005]. Наличие на раковине продольной полосы (П+) свидетельствует о гомозиготности особи по рецессивному аллелю наличия полосы [Хохуткин, 1979].

Перед проведением анализа эстераз проводилось экстрагирование белкового компонента из образца ткани путем его помещения в 40% водный раствор сахарозы с красящим агентом, в роли которого выступал бромфеноловый синий. Для получения белковой вытяжки раствор выдерживался сутки при температуре –18°C, после чего центрифугировался в течение получаса при 10 000 оборотах в температуре 4°C. На каждую ячейку камеры использовалось по 15 мкл полученного экстракта.

Разделение белкового компонента исследуемых образцов производилось методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ)

концентрацией 7,5% в трис-глициновом буфере со значением $\text{pH}=8,3$, при напряжении 120 вольт. Также использовался крупнопоровый концентрирующий гель на основе полиакриламида с рибофлавином в роли катализатора к полимеризации. Процедура длилась до выхода из основного геля метки с красящим агентом, для получения более качественного результата использовалось охлаждение камеры. Результатом проведения электрофореза становилась электрофореграмма, аналогичная показанной на рисунке 5.

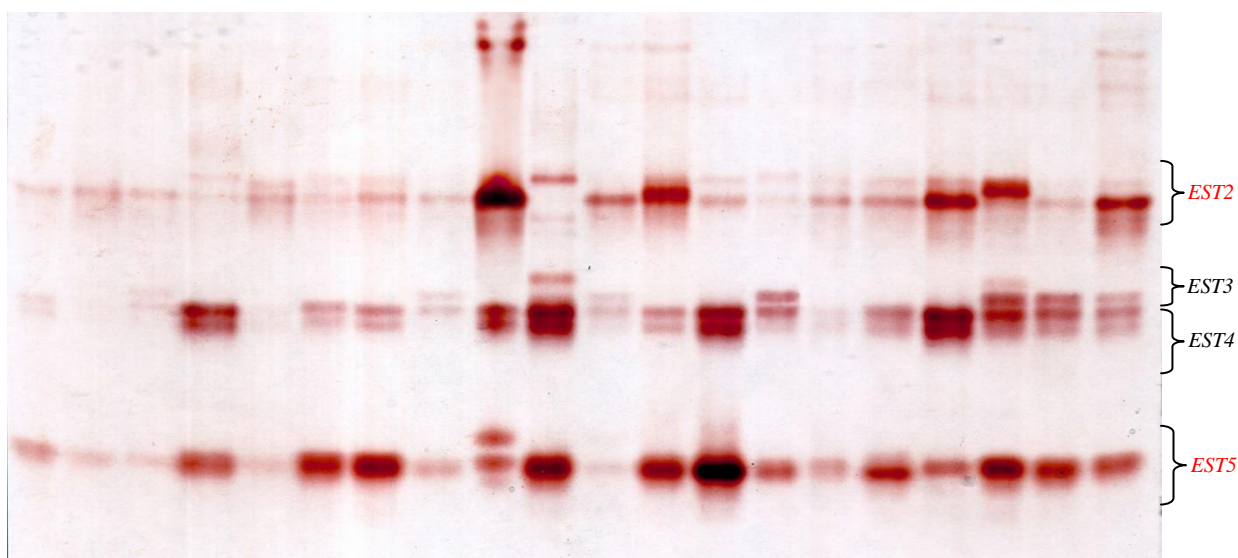


Рис. 5. Электрофореграмма неспецифических эстераз *F. fruticum*

Для регистрации на фореграмме непосредственно неспецифических эстераз использовалась их специфическая окраска. По завершению процедуры электрофореза гель вымачивался в холодном 3% водном растворе борной кислоты в течение 20 минут, после чего помещался в красящий раствор для эстераз, основными действующими компонентами в котором выступали α -нафтилацетат и прочный красный TR. Инкубация в данном растворе длилась до прокрашивания геля, от 45 мин до 1,5 часов.

После проведения процедуры окраски на электрофореграмме возможна идентификация аллельного состояния локусов эстераз в образцах.

3.4. Статистические методы обработки результатов

Использовались стандартные методики, применяемые при исследовании морфогенетической структуры наземных брюхоногих моллюсков [Оценка ..., 2017, Статистические ..., 2012].

Для оценки конхиометрических показателей внутри выборок подсчитывались средние значения признаков и устанавливалась корреляция между ними, полученные показатели проверялись на достоверность.

Средние значения признаков высчитывались по формуле среднего арифметического:

$$M = \frac{\sum V}{n}, \quad (1)$$

где M – среднее арифметическое;

V – дата признака;

n – объём выборки.

Ошибка среднего арифметического вычислялась по формуле:

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \quad (2)$$

где m – ошибка среднего арифметического;

σ – стандартное квадратичное отклонение.

Среднее арифметическое и его ошибка образуют интервал $M \pm m$, в который укладывается от 70% всех значений исследуемого признака.

Для установления зависимостей проявления признаков друг от друга используется коэффициент корреляции между ними [Животинский, 1991].

$$r = \frac{\sum x_1 x_2}{v}, \quad (3)$$

где r – коэффициент корреляции;
 x_i – нормированное отклонение дат исследуемого признака;
 v – число степеней свободы (количество исследуемых пар без 1).

Значения « r » лежат в пределах от 0 до 1 при прямой корреляции и от –1 до 0 при обратной корреляции. В случае если признаки независимы друг от друга, коэффициент корреляции равен 0, значение коэффициента до 0,3 – низкая корреляция, значения от 0,31 до 0,5 соответствуют умеренной корреляции, 0,51–0,7 – значительная корреляция, 0,71–0,9 – высокая корреляция, значения больше 0,91 – очень высокая корреляция [Животинский, 1991].

При использовании коэффициента корреляции следует соблюдать осторожность – так как он, фактически, представляет собой сравнение закономерностей изменений значений между двумя признаками, есть вероятность, что он покажет высокий уровень сходства для реально не связанных между собой вариантов. Достоверность полученных коэффициентов корреляции равна достоверности коэффициента регрессии для исследуемой пары признаков, и оценивается по формуле:

$$t_r = \frac{r_{1/2}}{m_r}, \quad (4)$$

где t_r – коэффициент достоверности корреляции ($t_r \leq 0,05$);
 $r_{1/2}$ – коэффициент корреляции между парой признаков;
 m_r – ошибка коэффициента корреляции.

Корреляция считается достоверной, если данный коэффициент меньше или равен стандартному значению для уровня значимости биологических исследований ($P \leq 0,05$).

Для сравнения значений конхиометрических признаков между выборками использовались однофакторный дисперсионный анализ в Microsoft Ex-

cell 2011 (ANOVA) и кластерный анализ на основе эвклидовых расстояний между морфометрическими признаками.

Однофакторный дисперсионный анализ сводится к выяснению достоверности межгрупповых различий по отношению к величине внутригрупповой дисперсии. Оценка достоверности этих различий осуществляется с помощью критерия Фишера:

$$F = \frac{\sigma_{x1}^2}{\sigma_{x2}^2} \text{ (при } \sigma_{x1} \geq \sigma_{x2} \text{),} \quad (5)$$

где F – критерий Фишера (различия достоверны при $F \geq F_{st}$);

σ_{x1} – стандартное квадратичное отклонение признака в первой группе;

σ_{x2} – стандартное квадратичное отклонение признака во второй группе.

Кластерный анализ заключается в группировании элементов выборки в кластеры – относительно однородные по совокупности параметров группы. Кластерный анализ морфометрических признаков был проведен в программе Statistika 6.

Для описания генетической структуры применялись методы оценки генетического расстояния и генетического разнообразия. Предварительно был проведен анализ частот аллелей локусов исследуемых эстераз и учёт гомозигот по фенетическим признакам раковины. Также для оценки генетической структуры популяций использован коэффициент инбридинга, являющийся характеристикой родства особей внутри популяции. Генетическое расстояние по Нэи [Nei, Li, 1979] рассчитано в программе GenAlExv 6.5 [Peakall, Smouse, 2006], кластерный анализ полученных данных проведен в программе MEGA6 [Tamura et al., 2013].

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Результаты исследования морфометрической структуры

Всего в ходе данного исследования на предмет полиморфных признаков раковины, а также на состав локусов неспецифических эстераз, были изучены 152 улитки вида *F. fruticum* (Müll.)

Из пункта сбора «Оленьи ручьи» (1) исследовано 99 особей, из пункта сбора «Кудымкар» (2) – 53 особи. Средние значения параметров раковин представлены в таблице 2.

Таблица 2

Средние значения морфометрических признаков раковины ($M \pm m$, $p=0,05$)

Пункт	ЧО	Б.Д., мм	М.Д., мм	В.Р., мм	В.У., мм	Ш.У., мм
1	4,14±0,06	11,167±0,29	9,314±0,266	8,707±0,244	5,923±0,162	5,982±0,171
2	4,33±0,07	12,632±0,422	10,311±0,308	10,349±0,375	6,509±0,239	6,415±0,211

Также следует рассмотреть значения коэффициентов корреляции морфометрических признаков и показатели их достоверности. Эти данные представлены в таблицах 3, 4.

Таблица 3

Корреляция конхиометрических признаков для популяции «Оленьи Ручьи»

r \ P	Обороты	Б.Д.	М.Д.	В.Р.	В.У.	Ш.У.
Обороты		$4,7 \cdot 10^{-15}$	$1,3 \cdot 10^{-16}$	$3,5 \cdot 10^{-15}$	$6,6 \cdot 10^{-13}$	$3,02 \cdot 10^{-14}$
Б.Д.	0,931		$1,5 \cdot 10^{-59}$	$3,8 \cdot 10^{-48}$	$1,0 \cdot 10^{-15}$	$4,8 \cdot 10^{-18}$
М.Д.	0,919	0,982		$3,9 \cdot 10^{-60}$	$3,3 \cdot 10^{-16}$	$7,2 \cdot 10^{-18}$
В.Р.	0,924	0,967	0,973		$9,4 \cdot 10^{-16}$	$5,4 \cdot 10^{-17}$
В.У.	0,873	0,911	0,903	0,912		$1,5 \cdot 10^{-29}$
Ш.У.	0,912	0,957	0,948	0,936	0,889	

Таблица 4

Корреляция конхиометрических признаков для популяции «Кудымкар»

r \ Р	Обороты	Б.Д.	М.Д.	В.Р.	В.У.	Ш.У.
Обороты		$4,3 \cdot 10^{-27}$	$1,1 \cdot 10^{-28}$	$1,1 \cdot 10^{-27}$	$1,5 \cdot 10^{-24}$	$2,7 \cdot 10^{-23}$
Б.Д.	0,948		$3,2 \cdot 10^{-30}$	$3,3 \cdot 10^{-40}$	$1,8 \cdot 10^{-31}$	$1,1 \cdot 10^{-26}$
М.Д.	0,955	0,961		$9,5 \cdot 10^{-30}$	$3,1 \cdot 10^{-24}$	$6 \cdot 10^{-25}$
В.Р.	0,951	0,984	0,959		$3 \cdot 10^{-28}$	$6,9 \cdot 10^{-25}$
В.У.	0,935	0,966	0,932	0,954		$1,12 \cdot 10^{-24}$
Ш.У.	0,926	0,946	0,937	0,937	0,936	

По данным таблицам можно судить о достоверно высокой степени пропорциональности строения раковин в обеих исследованных выборках, так как корреляция зависимостей каждого признака от всех остальных высока или очень высока.

Сравнение морфометрических показателей выборок проводилось с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, результаты сравнения представлены в таблице 5.

Таблица 5

Результаты однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA)

при $p=0,05$, $F_{st}=3,9$

Признак	Источник изменчивости	SS	MS	F	Значения Р
Ч.О.	Внутригрупповая	54,124	0,360	3,501	0,063
	Межгрупповая	1,263	1,263		
Б.Д.	Внутригрупповая	1220,742	8,477	8,552	0,004
	Межгрупповая	72,498	72,498		
М.Д.	Внутригрупповая	883,1052	6,09	5,537	0,02
	Межгрупповая	33,7213	33,721		
В.Р.	Внутригрупповая	908,997	6,269	14,569	0,0002
	Межгрупповая	91,332	91,332		
В.У.	Внутригрупповая	339,492	2,515	4,45	0,036
	Межгрупповая	11,19	11,19		
Ш.У.	Внутригрупповая	325,591	2,412	2,526	0,114
	Межгрупповая	6,09	6,09		

Опираясь на результаты однофакторного дисперсионного анализа, можно утверждать, что популяции достоверно отличаются друг от друга по всем исследованным параметрам, кроме числа оборотов раковины и ширины устья раковины, однако их сходство по данным параметрам не является достоверным. При этом внутригрупповые значения достоверно превосходят межгрупповые, что свидетельствует о большем сходстве особей внутри популяций, чем между ними.

Результаты кластерного анализа морфометрических признаков представлены в виде кладограммы (рис. 6), демонстрирующей эвклидово расстояние исследованных популяций в сравнении с полученными ранее данными по морфометрии данного вида. Эти данные представлены в таблицах 6, 7 [Снегин, 2010, 2012].

Таблица 6

Описание пунктов, взятых для сравнения

№ пункта	Название пункта	Описание природных условий в пункте сбора	Координаты пункта сбора
1	«Сев. Донец»	Пойма р. Северский Донец, окрестности г. Белгород. Заросли ивы и клена	50.363840° с. ш. 36.371919° в. д.
2	«Купянска»	Купянск. Пойма р. Оскол возле г. Купянск (Харьковская область, Украина). Пойменный ивовый лес	49.423760° с. ш. 37.372618° в. д.
3	«Дивногорье»	Памятник природы «Дивногорье» (Воронежская область). Пойма р. Тихая Сосна. Лопух, крапива, хмель	50.574899° с. ш. 39.174035° в. д.
4	«Киров»	Пойма р. Вятка. Территория городского парка г. Киров. Заросли крапивы и таволги.	58.345711° с. ш. 49.415075° в. д.
5	«Воргол»	Заповедный участок «Воргольское». (Липецкая область). Скальные выходы девонских известняков, в пойме р. Воргол	52.342532° с. ш. 38.210534° в. д.
6	«Олт»	Долина р. Олт, предгорье Трансильванских Альп возле пос. Авриг (Румыния). Пойменный лес из ивы и клена, каменистый грунт, сильное увлажнение, заросли крапивы, лопуха и хмеля	45.433687° с. ш. 24.203012° в. д.

Данный результат примечателен тем, что сходство популяций по совокупности морфометрических признаков не зависит от географического расположения района исследований. Это объясняется большей зависимостью

конхиометрических признаков от внешних условий, чем от генетической структуры особи [Крамаренко, 2014а].

Таблица 7

Данные для сравнения по морфометрическим параметрам

Пункт	N	ЧО	ВР	БД	ВУ	ШУ
Белгород	25	5,0±0,1	12,4±0,6	14,9±0,5	9,0±0,3	8,1±0,2
Купянск	25	5,3±0,1	16,3±0,5	19,2±0,5	10,7±0,3	10,1±0,3
Дивногорье	43	5,3±0,06	15,0±0,4	18,9±0,6	9,9±0,3	10,1±0,3
Воргол	28	5,1±0,1	15,1±0,5	18,2±0,7	10,1±0,2	11,4±0,3
Киров	13	5,0±0,05	13,8±0,4	17,3±0,6	9,2±0,2	9,5±0,3
Олт	57	4,7±0,1	10,6±0,5	12,7±0,5	7,9±0,2	6,6±0,3

Примечание: N – количество особей в выборке; ЧО – число оборотов; ВР – высота раковины; БД – большой диаметр; ВУ – высота устья; ШУ – ширина устья.

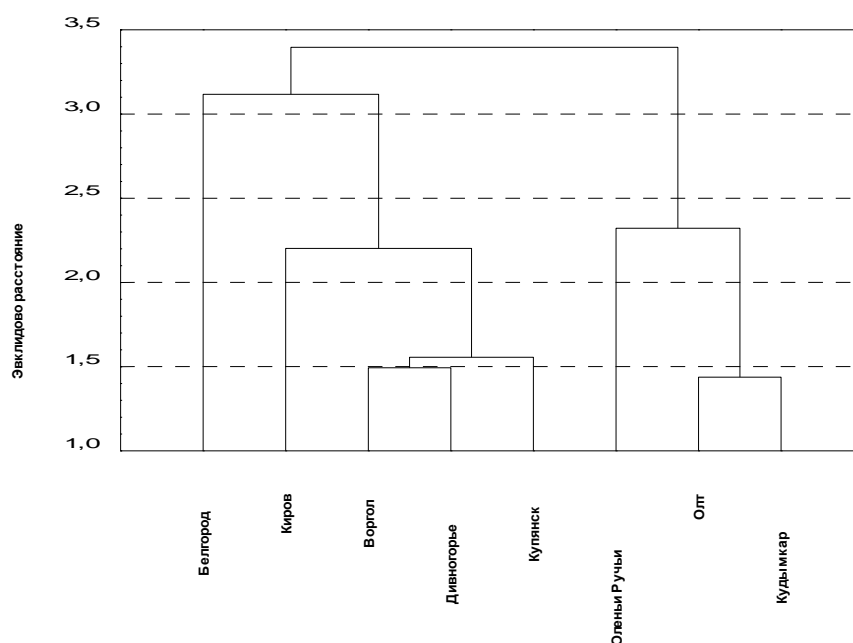


Рис. 6. Кладограмма популяций кустарниковой улитки (*F. fruticum* Müll.), построенная на основе эвклидова расстояния морфометрических признаков

4.2. Результаты исследования генетической структуры

Изучение генетической структуры популяций состояло из исследования эстераз и анализа четко генетически обусловленных фенетических признаков. Признаки окраски и опоясанности раковин представлены в таблице 8.

Таблица 8

Дискретные фенетические признаки раковин

Признак	Пункт сбора	Доля признака
Ц _з	Оленьи ручьи	84,8%
	Кудымкар	47,2%
П+	Оленьи ручьи	17,2%
	Кудымкар	15%

Из этого следует, что популяция кустарниковой улитки (*F. fruticum* Müll.) в Оленьих ручьях отличается значительно большей гомозиготностью по аллелю желтой окраски и – в меньшей степени – большей гомозиготностью по аллелю наличия полосы. Однако, так как окраска раковин имеет адаптационное значение, как маскирующая моллюска на фоне местности, а исследуемые зоны значительно отличаются друг от друга по своим характеристикам, причиной такому результату могло послужить действие механизмов естественного отбора. Для лучшей оценки реального аллельного состояния генофондов популяций использовался анализ локусов неспецифических эстераз. Все аллели неспецифических эстераз наследуются по кодоминантному типу. Всего в исследуемых пробах выявлено 4 локуса эстераз, их описание представлено в таблице 9 [Снегин, 2010].

Таблица 9

Количество аллелей в локусах неспецифических эстераз

Обозначение локуса	Аллельное состояние
EST 2	С тремя аллелями
EST 3	С тремя аллелями
EST 4	С пятью аллелями
EST 5	С пятью аллелями

Следует отметить, что в исследуемых пробах не были зарегистрированы аллели EST 4-5 EST 5-5, то есть локусы EST 4 и EST 5 присутствовали на электрофореграммах в четырехаллельном состоянии. Результаты анализа локусов неспецифических эстераз и показателей генетического разнообразия представлены в таблице 10.

Таблица 10

Частоты аллелей и показатели генетического разнообразия в популяциях кустарниковой улитки по локусам эстераз

Локус	Аллель	Оленьи ручьи	Кудымкар
EST2	1	0,000	0,019
	2	0,865	0,915
	3	0,135	0,066
EST5	1	0,000	0,000
	2	0,000	0,009
	3	0,989	0,972
	4	0,011	0,019
Ho		0,124	0,075
He		0,128	0,107
F		0,013	0,190

Примечание: Ho – наблюдаемая гетерозиготность, He – ожидаемая гетерозиготность, F – коэффициент инбридинга.

В расчетах были задействованы только локус EST2 и локус EST 5 [Макеева и др., 2005; Снегин, 2010, 2012], так как оставшиеся два локуса имели слабую активность.

По локусам эстераз генетическое разнообразие в популяции из пункта исследования «Оленьи ручьи» выше, чем в популяции из города Кудымкар, что противоречит данным по окрасочным признакам раковины. В то же время степень генетического разнообразия локусов неспецифических эстераз крайне низкая. Это связано с длительной изоляцией популяций Уральского региона и консервативным характером локусов неспецифических эстераз.

На основании расчетов аллельного состояния по локусам неспецифических эстераз была проведена оценка генетического расстояния между попу-

ляциями по методу Неи [Nei, Li, 1979], на её основе также была построена кладограмма (рис. 7):

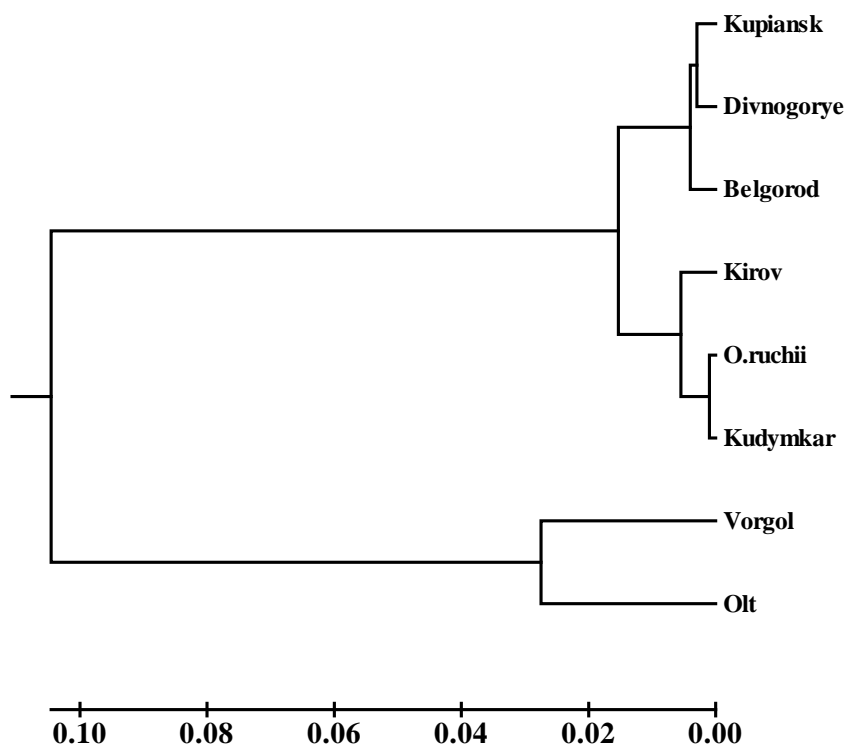


Рис. 7. Кладограмма популяций кустарниковой улитки, рассчитанная на основе генетического расстояния по Неи

Данная кладограмма отличается от похожей, рассчитанной для морфометрических характеристик раковины, значительно большей степенью сходства в популяциях, территориально близких по расположению, что связано с характером наследования и изменения данного признака, значительно полнее зависящего от генетической структуры, чем большинство полиморфных признаков раковины.

4.3. Обсуждение результатов

Проведенные исследования морфогенетических параметров демонстрируют разницу в характере кладограмм генетического расстояния в популяциях из исследованных участков и кладограмм, отражающих сходство

морфометрических признаков. Это можно связать с тем, что степень генетической детерминации аллозимов многократно выше, чем у большинства конхиологических признаков, и соответственно, структура популяций по данному параметру будет больше зависеть от основных генетических факторов, чем от изменения условий среды.

Полученные результаты генетической структуры популяций кустарниковой улитки (*F. fruticum* Müll.) свидетельствуют о меньшей степени генетического разнообразия (гетерозиготности) по локусам неспецифических эстераз в популяции, обитающей в черте города Кудымкар, чем у популяции того же вида, обитающей на территории природного парка Оленьи ручьи. При этом на территории Кудымкара отмечается меньшая гомозиготность по анализу окрасочных признаков раковины, а также несколько большие по размерам раковины улиток.

Различие в степени гетерозиготности популяций по вариантам окраски и по локусам неспецифических эстераз можно объяснить различным адаптационным характером данных признаков. Достоверно известно о наличии адаптационного значения различных локусов неспецифических эстераз [Адаптация ..., 1995], для изоферментов это обычно проявляется как разница в положении оптимального значения рН. Таким образом, разница в активности изоферментов вызвана различиями параметров среды. Различия в распределении вариантов окраски также, вероятнее всего, связаны с особенностями мест обитания популяций. Цветовая схема Ц₃ доминирует в местах с повышенным радиационным фоном [Снегин, 2010]. Природный парк «Оленьи ручьи», где встречаемость данного варианта значительно выше, расположен на границе горной территории с высоким содержанием металлических руд, что определяет повышение фонового радиационного фона на данной территории и доказывается биоиндикаторным значением признака.

Объяснением же большего размера раковин кустарниковой улитки (*F. fruticum* Müll.) на территории г. Кудымкар может служить механический состав почв — так как зиму данный вид может пережить, закапываясь в почву

на глубину до 20 сантиметров, в условиях более плотного почвенного покрова особи с небольшой раковиной будут лучше приспособлены к зимовке. Внутри черты города механический состав почв обычно более рыхлый ввиду действия различных процессов антропогенного происхождения, в основном связанных с функционированием различных систем городской инфраструктуры. Плотность почв на территории природного парка, не испытывающих антропогенного воздействия в столь сильной степени, будет значительно выше, что создает направление действия естественного отбора на сохранение вариантов с раковиной меньшего размера.

Однако также стоит учитывать, что конхиометрические признаки в высокой степени зависят от генетического состояния особи, и в большей степени — от пищевых условий, в частности, от содержания в почве солей кальция. В черте города, вероятно, присутствуют механизмы внесения в почвы данных соединений через водопроводную воду или иными путями, что отражается и на моллюсках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения ВКР были сформулированы следующие выводы об особенностях морфогенетической структуры исследованных популяций кустарниковой улитки (*F. fruticum* Müll.).

1. Результат анализа конхиометрических признаков показывает, что в обеих исследованных группах раковины улиток имеют пропорциональное строение, однако в Кудымкаре раковины *F. fruticum* несколько крупнее, чем в Оленьих ручьях.

2. По кладограмме конхиометрических признаков заметно разделение популяций вида *F. fruticum* на два кластера. Первый кластер больше соответствует популяциям, обитающим в равнинных формах рельефа, второй – в горных.

3. Полученные в ходе исследования данные о фенетических вариантах окраски раковины, выявили значительное преобладание желтой окраски ЦЗ в популяции «Оленьи ручьи». Учитывая имеющиеся данные о значении данного признака, можно судить о повышенном радиационном фоне на данной территории, связанным с её географическим расположением. При этом, по соотношению признака опоясанности раковины изучаемые популяции примерно равны.

4. Полученные в ходе исследования неспецифических эстераз данные свидетельствуют о низкой активности локусов EST 3 и EST 4 и о преобладании аллелей EST 2-2 и EST 5-3. Низкий уровень генетического разнообразия по локусам данного изофермента в популяциях связан с их длительным изолированным состоянием.

5. Оценка генетического расстояния по Неи демонстрирует взаимосвязь частот аллелей данного изофермента с территориальным расположением популяции, и позволяет выделить на востоке Европы Уральскую группу популяций и группу Среднерусской возвышенности.

Список использованных источников

1. Адаптация популяций: Информационный бюллетень РФФИ / П. В. Матёкин, М. М. Ганцевич, Е. А. Жуковская, Т. Н. Ивановская, Л. В. Пахорукова, Э. А. Снегин // Науки о земле. 1995. № 3. С. 12–22.
2. Бердников В. А. Основные факторы макроэволюции. Новосибирск: Наука, 1978. 226 с.
3. Борисова В. В., Гроздовой М. Д. Преображенская Н. С. Основы биохимии Ленинджера: учеб. пособие: пер. с англ. М.: БИНОМ, 1985. 636 с.
4. Воронов А. Г. Геоботаника: учеб. пособие. М.: Высш. школа, 1973. 384 с.
5. Догель В. А., Зоология беспозвоночных: учеб. пособие. М.: Высш. школа, 1981. 606 с.
6. Животинский Л. А. Популяционная биометрия: учеб. пособие. М.: Наука, 1991. 271 с.
7. Задвинский В. А. Кустарниковая улитка. Блог Натуралиста 2015 г. URL: <http://binomen.ru/index.php/molluski/28-fruticicola-fruticum> (дата обращения: 3.02.2018).
8. Зейферт Д. В. Действие естественного отбора на генетическую структуру популяций наземного моллюска *Bradybaena fruticum* (Müll.) // Журн. общ. биол. 1987. Т. 48, № 4. С. 549–554.
9. Зейферт Д. В., Хохуткин И. М. Использование наземных моллюсков для оценки качества окружающей среды // Экология. 1995. № 4. С. 307–310.
10. Землянухина О. А., Калаев В. Н., Воронина В. С. Сравнительный анализ методов определения активности и изоферментного анализа пероксидаз различного происхождения // Успехи современного естествознания. 2017. № 9. С. 13–22.
11. К вопросу о генетической эрозии и генетической революции в популяциях урбанизированных территорий на примере наземных моллюсков

/ Э. А. Снегин, О. Ю. Артемчук, А. А. Сычев, Е. С. Ненашева // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені В. Гнатюка. Серія Біологія. 2012. № 2 (51). С. 245–249.

12. Крамаренко С. С. Активная и пассивная миграция наземных моллюсков: обзор // *Ruthenica*. 2014б. Vol. 24, №. 1. Pp. 1–14.

13. Крамаренко С. С. Формирование паттернов пространственно-временной изменчивости наземных моллюсков: мультимасштабный подход: Дис. ... докт. биол. наук. Николаев, 2014а. 483 с.

14. Крамаренко С. С., Сверлова Н. В. Наземная малакофауна (Gastropoda, Pulmonata) Николаевской области // Вестн. зоологии. 2001. Т. 35, № 2. С. 75–78.

15. Макеева В. М., Белоконь М. М., Малюченко О. П. Оценка состояния генофонда природных популяций беспозвоночных животных в условиях фрагментарного ландшафта Москвы и Подмосковья (на примере кустарниковой улитки *Bradybaena fruticum* (Müll.) // Генетика. 2005. № 11. С. 1495–1510.

16. Матекин П. В., Макеева В. М. Полиморфная система эстераз и пространственная структура вида у кустарниковой улитки (*Bradybaena fruticum* Mull). Журн. общей биологии. 1977. Т. 38, № 6. С. 912–915.

17. Новороцкая А. Г., Ионкин К. В. Биологический мониторинг состояния окружающей среды в районе оловодобычи // Успехи современного естествознания. 2017. № 9. С. 89–94.

18. Остерман Л. А. Методы исследования нуклеиновых кислот: учеб. пособие // М.: Наука, 1981. 288 с.

19. Оценка генетических дистанций между некоторыми видами семейства *Bradybaenidae* (Mollusca, Pulmonata) / Снегин Э. А., Сычев А. А., Гребенников М. Е., Снегина Е. А. // Генетика. 2017. Т. 15, № 3. С. 240–248.

20. Перфильев А. С. Основные особенности геосинклинальных структур Урала // Тр. Геол. института АН СССР. 1992. № 3. С. 95–112.

21. Снегин Э. А. Эколого-генетические аспекты расселения *Bradybaena fruticum* (Müll.) (Mollusca, Gastropoda, Pullmonata) в элементах лесостепного ландшафта // Экология. 2005. № 1. С. 42–57.
22. Снегин Э. А. Оценка состояния популяционных генофондов особо охраняемого вида *Hepicopsis striata* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) на основе ДНК маркеров // Экологическая генетика. 2015. Т. 8, № 3. С. 28–38.
23. Снегин Э. А. Анализ генетической изменчивости популяций наземного моллюска *Bradybaena fruticum* (Müll.) с использованием RAPD и ISSR маркеров // Научные ведомости БелГУ. 2011. № 15 (110). Сер. Естественные науки. Вып. 16. С. 37–43.
24. Снегин Э. А. Временная динамика частот полиморфных признаков раковины в популяциях *Bradybaena fruticum* (Müll.) (Gastropoda, Pulmonata) на юге Среднерусской возвышенности // Научные ведомости БелГУ. 2013. № 10 (153). Сер. Естественные науки. Вып. 20. С. 87–91.
25. Снегин Э. А. Морфогенетические параметры популяций наземного моллюска *Bradybaena fruticum* (Müll.) в заповеднике «Галичья гора» // Научные ведомости БелГУ. 2010. № 3 (74). Сер. Естественные науки. Вып. 10. С. 28–33.
26. Снегин Э. А. Особенности генотипической структуры популяций кустарниковой улитки Трансильвании // Збірник наукових праць. 2-й вып. Житомир: Вид-во ЖДУ ім. І. Франка. 2006. С. 304–307.
27. Снегин Э. А. Пространственные и временные аспекты эколого-генетической структуры популяций беспозвоночных животных (На примере земных моллюсков и насекомых Среднерусской возвышенности): Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Белгород: Изд-во БелГУ, 2012. 41 с.
28. Снегин Э. А. Пространственные и временные аспекты эколого-генетической структуры популяций беспозвоночных животных (на примере наземных моллюсков и насекомых юга Среднерусской возвышенности): Дис. ... докт. биол. наук. Белгород, 2012. 473 с.

29. Снегин Э. А. Структура расселенности *Bradybaena fruticum* (Müll.) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) в условиях юга лесостепной зоны Русской равнины: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: Изд-во МГУ, 1999. 22 с.
30. Снегин Э. А., Адамова В. А. Бархатов А. С. Анализ генетической структуры популяций чужеродных видов наземных моллюсков на территории города Белгород // Актуальные вопросы современной малакологии. Белгород, из-во БелГУ, 2017. С. 9–11.
31. Снегин Э. А., Артемчук О. Ю. Морфогенетический анализ популяций *Helix pomatia* (Pulmonata, Helicidae) юго-восточной и восточной части современного ареала // Экологическая генетика. 2014. Т. 12, № 4. С. 25–35.
32. Снегин Э. А., Гребенников М. Е. Анализ изменчивости модельных видов наземных моллюсков в популяциях Урала и Среднерусской возвышенности // Научные ведомости БелГУ. 2011. № 9 (104). Сер. Естественные науки. Вып. 15. С. 67–69.
33. Снегин Э. А., Оценка состояния популяционных генофондов наземных моллюсков в условиях влияния горно-обогатительных комбинатов на примере *Bradybaena fruticum* (Müll.) (Gastropoda, Pulmonata) // Экологическая генетика. 2010. Т. 8, № 2. С. 45–55.
34. Снегин Э. А., Присный А. В. Новые сведения о наземных моллюсках Среднерусской возвышенности // Научные ведомости БелГУ. 2008. № 3 (43). Сер. Естественные науки. Вып. 6. С. 67–69.
35. Снегин Э. А., Снегина Е. А. Оценка состояния популяционных генофондов малоподвижных видов животных на примере наземного моллюска *Bradybaena fruticum* (Mull.) (Gastropoda, Pulmonata) с использованием ДНК маркеров // Экологическая генетика. 2017. Т. 15. № 3. С. 5–15.
36. Статистические методы в изучении континентальных моллюсков / М. В. Винарский, С. С. Крамаренко, Е. А. Лазуткина, А. Г. Патюков // Статистические методы анализа в биологии и медицине. Вариант Омск. 2012. С. 5–94.

37. Фауна, экология и внутривидовая изменчивость наземных моллюсков в урбанизированной среде / Н.В. Сверлова и др. // Научные записки гос. природного музея. 2006. № 5. С. 151–226.
38. Хотинский Н. А. Главные этапы развития растительности и климата Урала в голоцене // Вопросы археологии Урала, институт географии АН СССР. 1982. № 35. С. 145–166.
39. Хохуткин И. М. О наследовании признака «опоясанности» в естественных популяциях наземного брюхоногого моллюска *Bradybaena fruticum* (Müll.) // Генетика. 1979. Т. 15. № 5. С. 868–871.
40. Хохуткин И. М., Зейферт Д. Ф. Экология кустарниковой улитки *Fruticicola fruticum* (Müll.). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010. 92 с.
41. Хохуткин И. М., Лазарева А. И. Биотопическая и географическая изменчивость полиморфной структуры популяций *Bradybaena fruticum* (Müll.) // Моллюски. Систематика, экология и закономерности распространения: 7 Всесоюз. Совещ. по изучению моллюсков: Автореф. докл. Л., 1983. Сб. 7. С. 62–63.
42. Шешеня А.В. Влияние влажности на активность разных видов брюхоногих моллюсков (Gastropoda) в экспериментальных условиях // Вестн. зоологии. 2001. Т. 35. № 2. С. 75–78.
43. Шилейко А.А. Фауна СССР – Моллюски. Т. 3. Вып. 6. Л.: Наука. 1978. С. 193–276.
44. Яблоков А.В. Популяционная биология: учеб. пособие. М.: Высшая школа, 1987. 303 с.
45. Яворницкий В.И., Здун В.И. Моллюски подстилок грабовых дубрав верховья бассейна Днестра // Вестник зоологии. 1985. № 6. С. 75–78.
46. Baur B. Intensified grazing affects endemic plant and gastropod diversity in alpine grasslands of the Southern Carpathian mountains (Romania) // Biology. 2007. Vol. 62. Pp. 438–445.

47. Bayer W.N., Saari D.M. Effect of tree species on the distribution of slugs // *Journal of Animal Ecology*. 1977. Vol. 46. Pp. 695–704.
48. Crow J. F., Kimura M. An introduction to population genetics theory // New York: Harpers and Row, 1970. 591 p.
49. Crow J.F., Morton N.E. Measurement of gene frequency drift in small population // *Evolution*. 1955. Vol. 23. № 9. Pp. 202–214.
50. Falniowski A. Intra- and interpopulation genetic differentiation and gene flow in a group of isolated populations of *Bradybaena fruticum* (Müll.) in South Poland // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2004. Vol. 42. Pp. 70–80.
51. Fournii J., Chitail M. Calcium dynamics in land gastropods // *American Zoologist*. 1984. Vol. 24. Pp. 857–870.
52. Grossu A. Die Variabilität von *Bradybaena fruticum* (Müll.) mit Beschreibung einer neuen Unterart aus Rumänien // *Malakologischen Abhandlungen Tiermuseum Dresden*. 1980. Vol. 6. Pp. 213–267.
53. Johannessen L.E. Effects of experimentally increased calcium levels in the litter on terrestrial snail populations // *Pedobiologia*. 2001. Vol. 45. Pp. 234–242.
54. Jurickova L., Land snail distribution patterns within a site: The role of different calcium sources // *European Journal of Soil Biology*. 2007. Vol. 44. Pp. 172–179.
55. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms restriction endonucleases // *Proceedings the National Academy Sciences*. 1979. Vol. 76. Pp. 5269–5273.
56. Peakall R., Smouse P. E. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol. Notes*. 2006. Vol. 6. Pp. 288–295.
57. Tamura K., Stecher G., Peterson D. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Mol. Phyl. and Evol.* 2013. Vol. 30. Pp. 2725–2729.

58. Welinder K.G. Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c peroxidase // *European Journal of Biochemistry*. 1985. Vol. 151. № 3. Pp. 497–504.